

血流調節因子の生物学的効力試験法の検討（その2）

著者	篠田 雅人, 鴨川 旭, 中島 久夫, 宇津木 節子, 森田 ひさ子
雑誌名	星薬科大学紀要
号	14
ページ	83-87
発行年	1972
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000023/

血流調節因子の生物学的効力試験法の検討（その2）¹⁾

篠田雅人, 鴨川旭, 中島久夫, 宇津木節子, 森田ひさ子
星薬科大学²⁾

Establishment on Bioassay Method of Vasodilator, II¹⁾

MASATO SHINODA, ASAHI KAMOGAWA, HISAO NAKAZIMA,
SETSUO UTSUGI and HISAKO MORITA

Hoshi College of Pharmacy²⁾

In the measurement of blood flow used the electromagnetic meter, the femoral artery of dog was available. But rabbit was not available since it had less sensitivities for kallikrein and heparin. The equal responses were shown at administrating kallikrein to any place of rubber tube in the bypass. It was found that this method was valuable as the bioassay of vasodilator and dose-response curve for kallikrein was shown significant line.

前報¹⁾において、非観血式電磁血流計が生物学的試験法として、有効であることを報告した。しかし、非観血法では測定に使用する血管の外径に制限があり、血液の流速を血管壁の外側から測定するために、精度が劣ると考えられる。これに対して、観血式電磁血流計では血液の流れと直角の方向に磁場を作るための磁石を管の中に固定し、その管に血液を灌流して測定する。この観血式電磁血流計を用いた血流調節因子の生物学的効力試験法の開発を目的とし、また血流調節因子の標準物質としてブタ膵臓製カリクレインを用いて、動物の選定、血流増加反応と薬物の投与量の直線性等の基礎的検討をおこなった。

実験方法

実験動物 イヌとウサギを用い、イヌは4.3-17.0 kgの成熟したものを使用し、ウサギは4.3 kgの成熟したものを使用した。

試薬の調製

a) ウレタン溶液：ウレタン（和光、特級）を蒸留水で20%の濃度に溶した液。

b) ペントバルビタール溶液：ペントバルビタールナトリウム（田辺製薬、注射用）を注射用蒸留水で5%の濃度に溶した液。

c) ヘパリン溶液：ヘパリンナトリウム（和光）を蒸留水に300u/mlの濃度に溶した液、あるいはヘパリンナトリウム注射液（持田）を1000u/mlの溶液として使用した。

d) カリクレイン溶液：ブタ膵臓アセトン乾燥粉末（1.3u/mg）100mgに生理食塩水約70mlを加え、約1時間攪拌して抽出した。さらに生理食塩水を加えて、全量100mlとしたのち抽出液を濾過し、その濾液を試料とした。

測定装置と灌流回路の接続 血流測定装置（日本光電製、MF-2 T）の磁石が露出している管の両側に長さ6～8 cmの点滴用の肉厚ゴム管で2本のカニューレを取り付ける。ガラス製カニューレは重クロム酸-硫酸混液に浸した後、水洗いしたものを使用した。測定に際してカニューレ、ゴム管、測定装置等の灌流管内に生理食塩水を満たしたのち、空気の入ることを防ぎながらカニューレを血管内に挿入する。この操作はまず露出した血管をブルドックで心臓に近い部位で止血し、さらに4 cmの距離を置いて、ブルドックで血管を押える。眼科用バサミで、ブルドックの間に2箇所、穴を開け、カニューレを取り付ける。2個のブルドックをはずし、血液を灌流し始めたならば、ただちにヘパリン300u/mgを投与する。さらに1時間毎に300u/個体のヘパリンを追加した。（Fig. 1 参照）。

灌流血液の流速の変化を電圧の変化として、測定装置で捕える。ここで得られた信号を電磁血流計（日本光電製、MF-2）で校正し、増幅器（日本光電製、AD 3-2）で増幅し、ペン書きオシロスコープ（日本光電）にチャートとして示した。

結 果

I. 使用動物および測定部位の選定

1) その1：篠田雅人, 鴨川旭, 林八重子：星薬科大学紀要13号, P. 109(1971)。

2) Location: Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo.

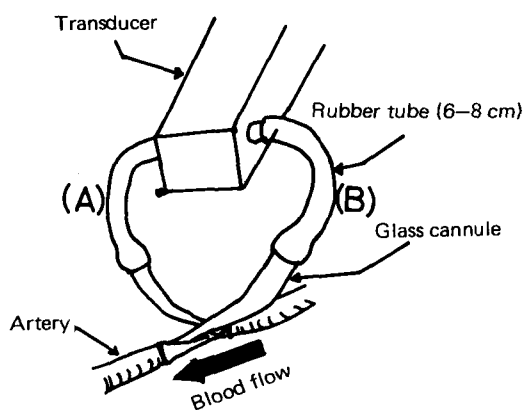


Fig. 1. Bioassay of Blood flow in Artery

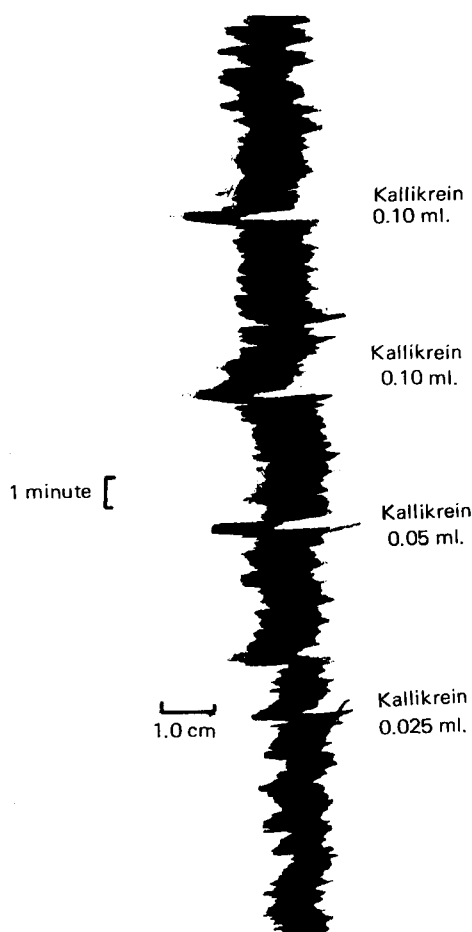


Fig. 2. Responses of kallikrein at Carotid Artery of Rabbit
Body weight: 4.3 kg
Activity of Kallikrein: 1.3 u/ml.

ウサギにウレタン溶液を 5 ml/kg 腹腔内注射して麻酔したのち背位に固定し、頸動脈を露出して Fig. 1 に示した灌流回路を作り、血流の変化により薬物の効果を測定し、効力試験法に適する使用動物の種類および測定部位の選定をおこなった。

ウサギの場合、ヘパリン溶液を 1279.1 u/kg 投与しても、血栓を生じやすく、それがカニューレの先端に詰り、血液が灌流しなくなることが多かった。このような場合にはカニューレの交換や血栓を除去することが必要となり、また血液が灌流している時でもベースラインに乱れを生じ、カリクレインを投与した場合の反応量も少なかった (Fig. 2)。

犬の場合は、ペントバルビタールの $25-30 \text{ mg/kg}$ を血流測定に使用しない側の後肢静脈あるいは腹腔内に注射して麻酔した。背位に固定したイヌの股動脈または前肢動脈を露出し、Fig. 1 に示した灌流回路を作った。イヌの前肢動脈と後肢動脈はともにベースラインの安定性とカリクレインに対する感受性が良好であり、効力試験に使用できた (Fig. 3, 4)。

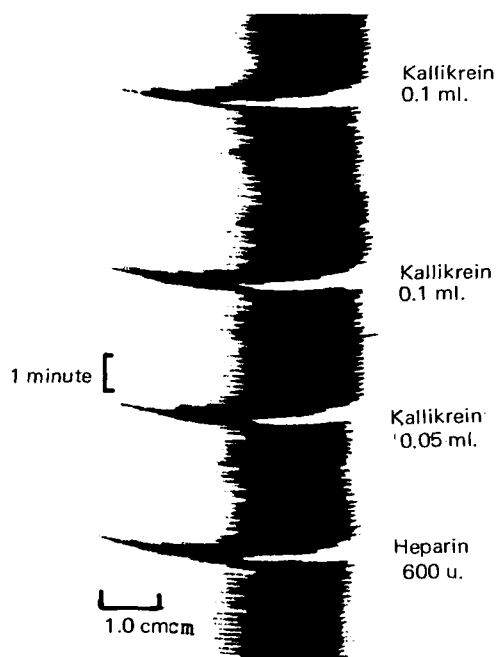


Fig. 3. Responses of Kallikrein at Arm Artery of Dog.
Body weight: 10.0 kg
Activity of Kallikrein: 1.0 u/ml

II. 薬物の投与位置の検討

血流増加反応を測定するための薬物は $\frac{1}{2}$ 注射針と0.25ml注射筒を使用して投与した。投与部位はFig. 1に示すように、動脈より灌流回路に入る側のゴム管〔A〕と、測定装置を通過してふたたび動脈へ血液を流入する側のゴム管〔B〕の2箇所が可能であった。ゴム管〔A〕と〔B〕にカリクレイン溶液の0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16mlを投与した場合の、各用量に対応する反応は投与部位の違いによっても差を認めなかった (Table I)。

TABLE I. Responses and Administrating position of Sample

Dose (ml.)	Responses (mm)	
	A	B
0.01	15.0	15.0
0.02	26.0	21.0
0.04	35.0	33.0
0.08	39.0	38.0
0.16	46.0	48.0

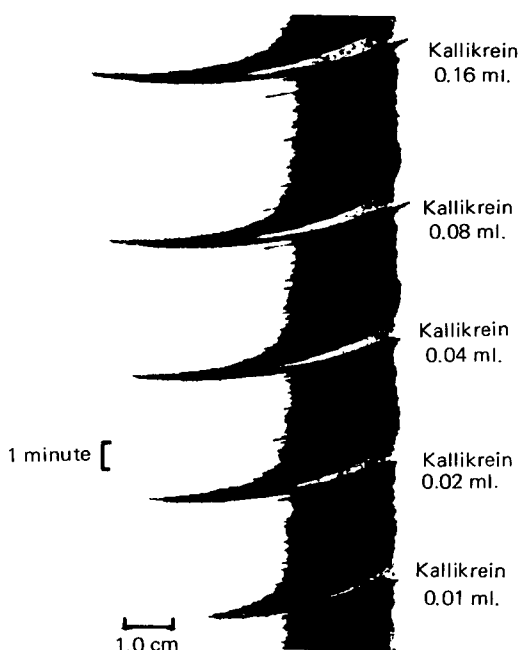


Fig. 4. Responses of Kallikrein at Femoral Artery of Dog.

Body weight: 7.0 kg

Activity of Kallikrein: 1.3 u/ml.

III. 用量と反応の直線性の検定

カリクレイン溶液を0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 mlの5用量について、記載した順序に投与したものを1組として計6組分を投与し、用量と血流増加反応の直線性を検討した (Table II)。

0.01—0.16ml (0.03—0.28u)の用量の間で危険率5%で有意な直線性を認め、ここに得られた用量反応直線 ($Y = 26.2X - 39.5$)の回帰係数も危険率5%で有意性であることを確認した (Fig. 5)。

TABLE II. Responses and Dosages of Kallikrein

Dose (ml.)	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16
Response (mm)	13.5	25.0	32.0	42.5	50.0
	12.0	26.0	36.0	43.0	46.0
	15.0	26.0	35.0	39.0	46.0
	15.0	21.0	33.0	38.0	48.0
	17.0	30.0	34.0	40.0	44.0
	16.0	25.5	33.5	41.0	47.0
Mean \pm s.d.*	14.8 \pm 1.8	25.6 \pm 2.9	33.9 \pm 1.4	40.6 \pm 2.0	46.8 \pm 2.0

* Standard deviation

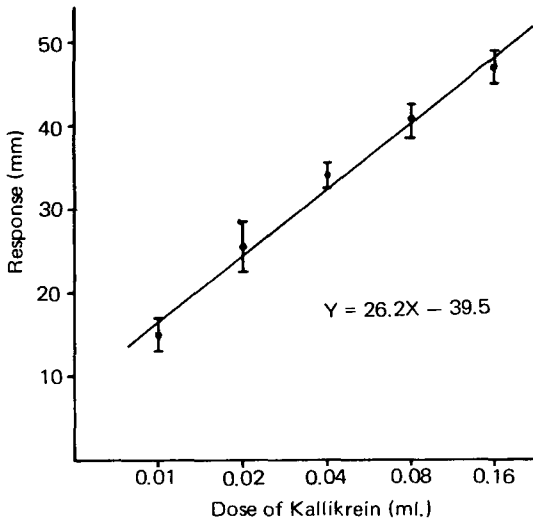


Fig. 5. Relation between Dose of Kallikrein and Response of Blood Flow.
Animal: Dog. 7.0 kg
Activity of kallikrein: 1.3 u/ml.

IV. 反応の再現性におよぼす測定時間の影響

カリクレイン溶液の0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 mlを同一個体に投与した場合、手術後の時間経過の反応量におよぼす影響について薬物投与開始後4時間まで検討した (Fig. 6). いずれの投与量においても、測定開始後3時間の範囲では反応量に大きな差は認められなかった。

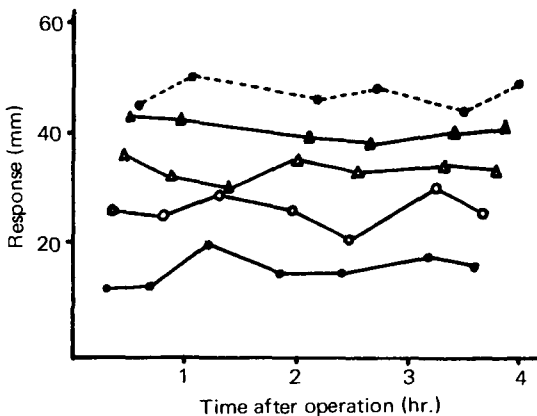


Fig. 6. Reappearance of Response and Time after Operation.

Animal: Dog 7.0 kg

Activity of kallikrein: 1.3 u/ml.

- Dose of kallikrein: 0.01 ml.
- " : 0.02 ml.
- △—△ " : 0.04 ml.
- ▲—▲ " : 0.08 ml.
- " : 0.16 ml.

V. 投与量の影響

ブタ脾臓アセトン乾燥粉末3.2gを生理食塩水40mlで抽出してその滲液を生理食塩水で4倍希釈したものを原液とし、この原液をさらに生理食塩水で2, 4, 8, 16, および400倍希釈して、原液の0.025mlと同一効力になるように各希釈液の液量を計算し、0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 10mlを投与して各々の反応を比較したが各々の希釈液では反応量に差は認められなかった (Fig. 7).

Volume (ml.)	Mean of responses (mm)			
	10	20	30	40
0.025				
0.050				
0.100				
0.200				
0.400				
10.0				

Fig. 7. Volume Effects on the Responses at Administration of the equal Kallikrein Activity (0.25 u)

VI. 同一部位の反復使用による影響

第一日目の測定終了後、ガラス製カニユーレを出血しないようにブルドックで押えた動脈からはずし、テフロン管 (直径2mm) を血管に挿入して固定し、血液が流れるようにする。その後で表皮を縫合して、イヌは移動ケージ中に休息させた。翌日、ペントバルビタールの25-30mg/kgを投与して麻酔した後に、前日に使用した動脈を露出し、テフロン管をはずし、ガラス製カニユーレを挿入して、ふたたび灌流回路を作り、血流を測定した。このように同一部位の血管を翌日使用した場合には、ヘパリン溶液を投与しても、測定中に血栓を生じやすくなり、カニユーレから血栓を除くために、カニユーレを交換する回数が多く、また、ベースラインも乱れを生じ測定は困難であった。

考 察

実験動物としてイヌとウサギを比較すると観血法においても、非観血法の場合¹⁾と同様にイヌが優れていた。ウサギはヘパリンの消費量が犬の4倍も多く、またFig. 2に示したようにカリクレインに対する感受性も低いことから、本実験の使用には無理と考える。なお、観血法では血栓が生じるのを防ぐためにヘパリンを投与し、さらにカニユーレに附着した汚れが血栓の原因となるので重クロム酸-硫酸混液で汚れを除いた。灌流回路に使用したゴム管は市販のものでは注射針の穴から出血し易いので点滴用の肉厚ゴム管を使用した。

観血法では血管の長さ4 cm程度露出されれば測定が可能であるが、非観血法では薬物投与のための動脈細管が必要であるので、測定に使用する動脈の部位に制限がある。血管露出までの操作、血管に制限のないことで観血式は優れている。また、観血式はイヌの前肢動脈においても可能であったが、股動脈の露出が簡単であることから、観血法による血流測定方法の基礎的実験は主としてイヌの股動脈を用いて検討した。

灌流回路の始めと終りでは投与した薬物が安定な物質では投与部位による差は生じないと思われるが、血液中に分解酵素あるいは阻害物質が存在する物質は投与部位により反応に差が生じると思われる。カリクレインによって遊離されたキニンは血液中のキナーゼにより分解される³⁾そこで、カリクレインを投与して、反応の投与部位の差による影響を検討したのが、Table Iである。カリクレインによって遊離したキニンは1分後から減少するといわれているので、³⁾本実験の灌流回路の長さではキナーゼの影響は認められないものと考えられるが、灌流回路の長いものではキナーゼの影響が表われる可能性があり、注意を要する。

同一用量の薬物を反復投与した場合の反応量は3時間変化を認めず、観血法は再現性において、非観血法より優れていることを認めた。しかし、翌日の反復測定は非観血法ならば可能であったが、観血法では血栓

のために困難であった。血栓の出現はヘパリンの投与により予防したが、1時間毎の投与では、まだ血栓を生じるイヌもあり、一度血栓を生じると以後も短時間で生じやすくなる。

少量の試料を精密に測定する場合は最少0.013uまで測定可能である観血法が優れており、多量の試料を長時間に測定する場合にはすでに報告した非観血法¹⁾が優れていることを認めた。

結 論

- 1) 電磁血流計を用いて観血法により血流量の変化を測定するには測定動物としてイヌが適当であり、その測定部位は股動脈が最適である。なお、ウサギは薬物に対する反応性が弱く、測定動物として不適当であった。
- 2) カリクレイン溶液は灌流回路のどの部位に投与しても血流増加効果に差を認めなかった。
- 3) カリクレイン溶液を投与した場合、0.013-0.208 uの間で、用量と血流増加反応の間に有意な直線関係が認められた。
- 4) 観血法による血流測定法は比較的微量の血流増加物質の効力試験法として有効である。

(Received September 2, 1972)

3) M. Rocha e Silva: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 104, 190 (1963).